

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-242547

(43)Date of publication of application : 19.09.1995

(51)Int.Cl.

A61K 31/415  
A61K 31/415  
A61K 31/415  
// C07D491/107

(21)Application number : 06-032304

(71)Applicant : SANWA KAGAKU KENKYUSHO  
CO LTD

(22)Date of filing : 02.03.1994

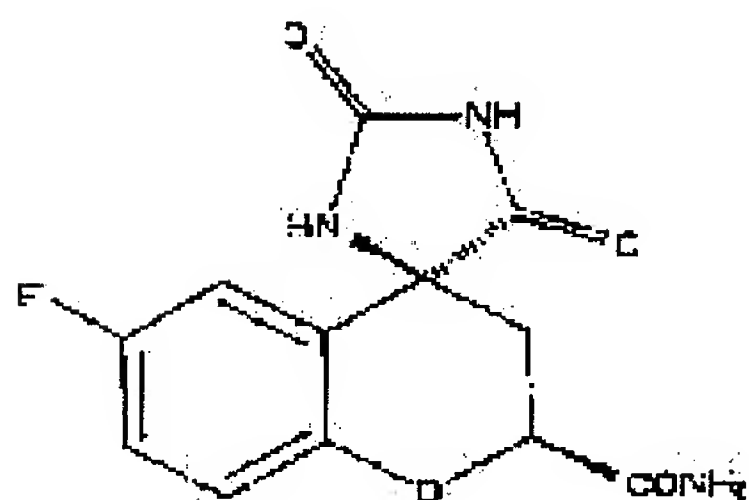
(72)Inventor : AKITA MASAHIKO  
MIZUNO KUNIHARU  
MATSUBARA AKIRA  
NAKANO KAZUMASA  
KURONO MASATSUNE

## (54) ADVANCEMENT INHIBITOR OR THERAPEUTIC AGENT FOR DIABETIC RETINOPATHY SIMPLEX

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the subject highly safe agent having the advancement- retarding/inhibitory activity for diabetic retinopathy simplex and the inhibitory activity for cataract coincidence, containing, as active ingredient, a specific coumarone derivative.

CONSTITUTION: This therapeutic agent contains, as active ingredient, (2S,4S)-6- fluoro-2',5'-dioxospiro[coumarone-4,4'-imidazoline]-2-carboxamide of the formula. It is preferable that the formulation of this agent be an oral agent like tablets blended with refined sugar, and the dose of this agent is 0.15-100mg a day per adult in terms of the compound of the formula and this agent is administered every day in one to several portions a day.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 27.02.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 14.03.2005

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

\* NOTICES \*

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

CLAIMS

---

[Claim(s)]

[Claim 1] 2S and (4S)-6-fluoro-2' and 5' -- the advance inhibition agent of a diabetic simple retinopathy which makes an active principle a chroman -4 and the - dioxo SUPIRO [4'-imidazoline]-2-carboxamide thru/or a therapy agent.

---

[Translation done.]

## \* NOTICES \*

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

## DETAILED DESCRIPTION

## [Detailed Description of the Invention]

[0001]

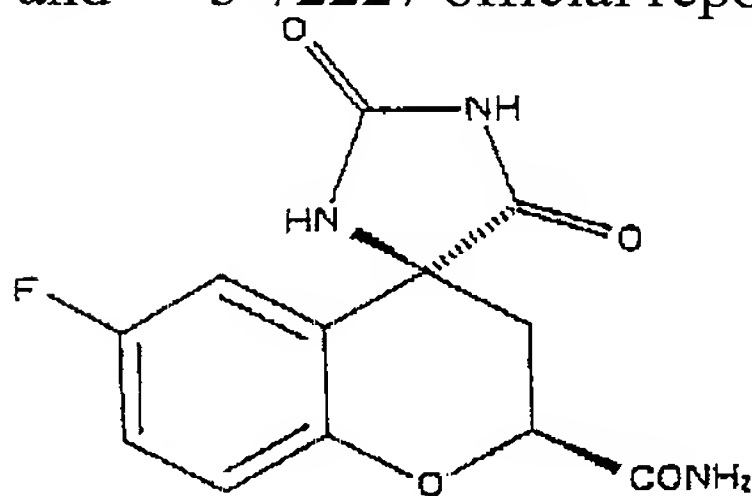
[Industrial Application] This invention relates to the advance inhibition agent thru/or therapy agent of a diabetic simple retinopathy.

[0002]

[Description of the Prior Art] The diabetic in our country is abbreviation potentially. 600 It is called everybody and predicted as what continues to increase increasingly with progress of eating-habits culture. Although a problem does not not much have diabetes mellitus in itself, it is intractable and a technical problem is to be easy to be accompanied by the chronic union disease. The diabetic retinopathy in which this invention participates is from the onset of diabetic. 10 A diabetic simple retinopathy may be concurred with in year remainder, subsequently to a fecundity retinopathy it may go on, amotio retinae may be produced, and loss of eyesight may be brought about. The effective therapy agent to this diabetic retinopathy is at an eyegrounds view, even if it is next to impossible rather than it says that perfect blood sugar control is very difficult, although place existence is not recognized to current but control of blood sugar is the only cure, and it controls considerably. It is very troublesome and development of an effective therapy agent was desired [ that advance of a symptom is certainly accepted in / 1-/ two years, etc. and ] strongly.

[0003] In addition, although the photocoagulation which is a surgical therapy and is confirmed uniquely is a cure for pre-growth and a fecundity retinopathy, progress of a retinopathy cannot be prevented but, finally may result in amotio retinae and loss of eyesight. Therefore, it is thought that diabetic retinopathy will also social-problem-ize the increment in a patient in the future near in respect of a health care cost, welfare, and the quality of life with last thing, and the cure is desired eagerly.

[0004] The researcher of this people firm which contains this invention person in a place Prevention of diabetic complications thru/or research on a therapy agent are wholeheartedly done from the former. A certain kind of hydantoin derivative has the inhibitory action to an aldose reductase. The polyol to which it is returned by the above-mentioned enzyme and an aldose, for example, a glucose, and a galactose correspond in in the living body, For example, it has already found out that it is promising for the prevention and the therapy of diabetic complications whose symptoms should become a sorbitol and galactitol, such polyols should be accumulated in the part, and shall be shown. (Japanese Patent Publication No. 3-72226 and \*\* 3-72227 official report) . Especially, it is a formula [\*\* 1].



It is alike and is shown. (2S, 4S) (although "S" should be essentially displayed by "italic type") -6-fluoro - 2', a chroman -4, 5'-dioxo SUPIRO [4'-imidazoline]-2-carboxamide since it becomes an external character -- English character -- S -- with -- \*\*\*\* -- it displays It is in the culmination of the clinical trial for receiving manufacturing approval as a diabetic nervous disease, i.e., the disease which it originates [ disease ] in diabetes mellitus and has the dorsal root of a spine, and back-housing invaded, and a therapy agent of a neuritis. (investigational new drug number :SNK-860) .

[0005]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] this invention person etc. is the above. (2S, 4S) -6-fluoro - 2', a chroman -4, 5'-dioxo SUPIRO [4'-imidazoline]-2-carboxamide ("SNK-860" may be called below) The



related research was further repeated from various fields. the result of having inquired among these researches by building the animal experiment model system which reflects the symptoms of human diabetic retinopathy, the advance situation of a symptom, etc. good -- this -- SNK-860 It has the pharmacological action which is not considered at all from the conventional aldose reductase inhibitor, Namely, streptozotocin ("STZ" is called Streptozotocin and the following) Medicate a rat and induction of the diabetic simple retinopathy is carried out. Subsequently, above-mentioned compound 12 KE The lesion in the place and retina which were prescribed for the patient every day over monthly, Namely, disappearance of the perithelium in formation of the wavelike structure in the outer layer of a retina, and an edema, and a retina capillary blood vessel wall, The hyperplasy of the basement membrane in a retina capillary and an eyegrounds view that generating of the microvessel phyma in an inner nuclear layer of retina is controlled notably are acquired. therefore -- SNK-860 -- a diabetic simple retinopathy -- receiving -- advance delay thru/or an inhibition operation -- having -- with -- \*\*\*\* -- it becomes clear that it has the operation which delays for it thru/or prevents the shift to a fecundity retinopathy from a simple retinopathy, as a result delays for it thru/or prevents amotio retinae and loss of eyesight, and it came to complete this invention in this way.

[0006]  
[Means for Solving the Problem and its Function] therefore, the summary of this invention -- 2S and (4S)-6-fluoro-2' and 5' -- it is in the advance inhibition agent thru/or therapy agent of a diabetic simple retinopathy which makes an active principle a chroman -4 and the - dioxo SUPIRO [4'-imidazoline]-2-carboxamide.  
[0007] With the usual pharmaceutical preparation technique, \*\* by this invention For example, a tablet, a capsule, A medicine can be parenterally prescribed for the patient as injections, suppositories, etc.-like. as powder, a granule, liquids and solutions, and syrups -- taking orally -- The excipient which can be admitted in pharmacology on the occasion of pharmaceutical-preparation-izing in the case of a solid preparation, for example, starch, A lactose, purified sucrose, a glucose, crystalline cellulose, a carboxy cellulose, A carboxymethyl cellulose, a carboxyethyl cellulose, calcium phosphate, Although magnesium stearate, gum arabic, etc. can be used, lubricant, a binder, disintegrator, coating, a coloring agent, etc. can be blended if required, and a stabilizer, a dissolution assistant, a suspending agent, an emulsifier, a buffer, a preservative, etc. can be used when it is liquids and solutions The oral agent which blended purified sucrose is desirable. A dose is [ as opposed to / in the usual case / an adult ] as the above-mentioned compound, although it changes with a symptom, age, the prescribing [ for the patient ]-a medicine method, pharmaceutical forms, etc. 0.125-100 mg/day 1 Sunny 1 It is desirable to prescribe a medicine for the patient every day in a time or several steps. In addition, it is the above although it needs to be pitched in successive games over a long period of time comparatively for the therapy of diabetic complications. SNK-860 In safety, the very high thing is already accepted.

[0008]  
[Example] etc. Next, the example of pharmaceutical preparation as an example, the example of a drug effect pharmacological test (animal experiment) And the example of a clinical trial explains this invention still in detail and concretely.

Example of pharmaceutical preparation (tablet) Many following components are blended and it tablets with a conventional method. 1000 The tablet of a lock was obtained. (each tablet is 1mg about SNK-860 which is an active principle addressing content) .

SNK-860	1.0 (g)
精製白糖	30.0
結晶セルロース	15.6
カルボキシメチルセルロース (Ca)	8.4
トウモロコシ澱粉	12.0
ステアリン酸マグネシウム	1.2
乳糖	残部
	100.0 (g)

[0009] Example of a drug effect pharmacological test (1) The trial purpose STZ The diabetes-mellitus rat in which induction was carried out by administration is received at the simple retinopathy whose symptoms are shown as complication. SNK-860 Effectiveness is investigated.

[0010] (2) A laboratory animal, test method (A), etc. Laboratory animal 7 It is week-old and is average weight abbreviation. 200g SD System male rat.

(B) Diabetes-mellitus induction medicine STZ (the U.S. and Sigma shrine make).

(C) Compound by the SNK-860 applicant firm 5% Thing which the Arab AGOMU solution was made to

suspend.

(D) To a medication method laboratory animal CRF-1 (thing of the Kanagawa \*\* and Charles liver Japan to marketing) It feeds and water is 12 as free intake. While repeating lighting and putting out lights in a time amount cycle 1 Week breeding was carried out and it was made to acclimate. (it is the same as that of the above-mentioned conditions after a habituation period) . Subsequently, laboratory animal 1 Per group 10 \*\* 3 It divides into a group and is a group. I It reaches. II In a laboratory animal, it is 0.05M. Citrate buffer solution (pH 4.5) It was made to dissolve. STZ Diabetes mellitus was made to induce by carrying out caudal vein administration at a rate of 40 mg/kg (weight). Group III In a laboratory animal, it is STZ. The caudal vein was medicated with the above-mentioned citrate buffer solution which is not contained, and it considered as control. STZ From administration 4 A heparinization blood collecting machine is used for eye a day, blood is extracted from a left eye blood vessel, and it is 4 degrees C. It sets. 1700 x g 10 Plasma was obtained by carrying out a part at-long-intervals alignment. Enzymatic process which makes this plasma a sample and uses glucose oxidase and a par oxidase (Glucose B-test Wako) Glucose concentration was presumed. Group I It reaches. II It is a laboratory animal and glucose level 300 mg/dl In the place and the last target which chose the above animal as an animal which showed the symptoms of diabetes mellitus, both groups are each. 5 It was \*\*. STZ After administration 4 Group [ from / a day ] I To an animal SNK-860 2 mg/kg (weight) At a rate 1 Day 1 It begins to administer orally to a time compulsion target, and is 12. KE Repetitive administration was carried out over the moon. Group which did not prescribe SNK-860 for the patient II STZ A diabetes-mellitus animal group and group III In a control group, it is SNK-860. Instead of 5% Repetitive administration of the gum arabic solution was carried out.

(E) Creation 12 of a sample KE By draining blood, after passing through the breeding period of a month, all laboratory animals are murdered and it is \*\*. The right eye ball of a laboratory animal is taken out immediately, and it is 0.1M. Cacodylic acid buffer solution (pH 7.4) It added. 2.5% Glutaraldehyde 4 degrees C It sets. 60 It processed between parts and fixed. After this fixed processing, it is cut open in the location of an anterior part segment, and is 4 degrees C. 24 A time amount incubation is carried out and it ranks second. 0.2% Sucrose content 0.05M Cacodylic acid buffer solution (pH 7.4) It moved. The organization was dehydrated with the ethanol gradient method and it embedded into paraffin. An explant is started so that it may become right-angled with a retina layer. (thickness three to 5 micrometer) Hematoxylin-EOSHI N (Hematoxylin-eosin, HE) Periodic acid Schiff reaction (periodicacid-Schiff reaction, PAS reaction) It dyed. For immunohistochemistry-dyeing of albumin, it is anti-rat serum albumin. Rabbit IgG Labeling SUTOREPUTABIJIN to be used Biotin Law (labelled streptaavidin biotin method, the product made from DACO, and LSAB a kit system is used) It adopted. SNK-860 to the vasculature of a retina in order to evaluate effectiveness -- PAS a dyeing sample -- subsequently -- all the retina layers of an albumin dyeing sample -- the periderm of a retina capillary, and the number of endothelial cell nuclei -- inner core layer from an outer plexiform layer (internal granular layer) up to -- and it measured from the inner plexiform layer to the nerve fiber layer.

[0011] (3) Result (A) It does to plasma glucose concentration and weight. SNK-860 Table of the effect following 1 It is as being shown. Group I ( STZ \*\*\*\*\*(ed) by SNK-860 diabetes-mellitus group) Plasma glucose level is a group. (STZ control group non-prescribed a medicine for the patient) III It is abbreviation when comparing. 2 Although it is twice Group II A measure was not taken in [SNK-860. STZ Diabetes-mellitus group (abbreviation of control group 2.5 twice)] It was clearly low.

[0012]

[Table 1]

	群 I	群 II	群 III
体重 (g)			
試験開始時	225 ± 2	229 ± 11 *	246 ± 7
試験終了時	312 ± 11	382 ± 10 *	657 ± 36
グルコース・レベル (mg/dl)			
試験開始時	402 ± 20 **	480 ± 82 **	82 ± 3
試験終了時	419 ± 41 **	502 ± 65 **	185 ± 20

It compares with a control group and they are those with a significant difference, and \*. : p < 0.05, \*\* : p <



0.01 (B) Formation HE of an edema and extraphysiologic wavelike structure The dyeing organization was inspected with the optical microscope. Group II (a measure was not taken in SNK-860 STZ diabetes-mellitus group) The extraphysiologic wavelike structure relevant to the desorption of a retina edema thru/or a cell was accepted in all examples. Especially 1 The example was a clear lesion. group I (a measure was taken in SNK-860 STZ diabetes-mellitus group) And group III (STZ control group non-prescribed a medicine for the patient) \*\*\*\* -- a retina edema, wavelike structure, and other related lesions 1 An example was not found, either. Group II Distortion of the retina tissue which originates in formation of the morbid wavelike structure in a retina in a rat was clearer than the inner layer of a retina in the outer layer. In the base of the wavelike structured division, it was observed frequently that the retina has exfoliated from a retinal-pigment-epithelium organization, and although a retinal-pigment-epithelium organization was not permitted aggravation thru/or degenerative change, it showed it the clear positive reaction to albumin dyeing. The edema observed by all the layers of a retina was remarkable in the optic nerve mammary-papilla field. STZ these lesions accepted in the diabetes-mellitus rat -- SNK-860 the diabetes-mellitus rat prescribed for the patient -- and -- STZ prescribing a medicine for the patient -- \*\*\*\*\* It did not accept to a \*\* control rat. Therefore, SNK-860 It became clear to check effectively formation of the edema in a stratum gangliosum and an inner plexiform layer.

(C) Lesion in a retina capillary (disappearance of capillary basement membrane thickening and the capillary perithelium) STZ Diabetes-mellitus rat (group II) Remarkable hyperplasy is shown in the outer layer of retina capillary basement membrane and a retina, and it sets for some example, and is a non-diabetes-mellitus rat. (group I and III) It is strong. PAS Dyeing was brought about. SNK-860 Treatment diabetes-mellitus rat (group I) It sets and is a control rat. (group III) It compared and was able to see for generally retina capillary basement membrane being thin. Although it is not clear from an intima-like layer to a nerve fiber layer, it is the number of blood vessel perithelium by the internal granular layer from the outer plexiform layer of a STZ diabetes-mellitus rat. (P) The number of vascular endothelial cells (E) Ratio (P/E ratio) Clear disappearance of the number of blood vessel perithelium shown was accepted. SNK-860 There is little disappearance of the blood vessel periderm stratum compactum remarkably, and it is normally near until a treatment diabetes-mellitus rat results [ from an outer plexiform layer ] in an internal granular layer. P/E The ratio was shown. The above-mentioned result is drawing. 1 It is shown.

(D) existence STZ of a microvessel phyma Diabetes-mellitus rat (group II) \*\*\*\* -- although formation of a microvessel phyma was observed by the retina capillary -- SNK-860 Treatment diabetes-mellitus rat (group I) And control rat (group III) \*\*\*\* -- it did not accept. Microvessel phyma accepted in an internal granular layer The corpuscle was filled to the tooth space in a blood vessel, the perimeter was surrounded by the endothelial cell, and the bore was vein size about. STZ In the outer plexiform layer of a diabetes-mellitus rat PAS It is SNK-860 although positive granulation was accepted in dyeing a little. Such an inclination was not accepted in a treatment diabetes-mellitus rat and a control rat at all.

(E) Immunohistochemistry-dyeing result STZ Diabetes-mellitus rat (group II) It was shown in the lower field of the wavelike structured division which can be set that immunohistochemistry-dyeing arose and that albumin was revealed, i.e., punctiform, the shape of a stain, and the splinter hemorrhage arose from the vasa sanguinea retinae.

(F) Existence STZ of cataract concurrence Diabetes-mellitus rat (group II) It sets for all examples and is STZ. From administration 3 KE A critical cataract was concurred with within the moon. SNK-860 Treatment diabetes-mellitus rat (group I) setting -- the onset of a cataract STZ From administration 6 KE a previous month -- being delayed -- and -- STZ From administration 6-12 KE Although the symptoms of a certain kind about a cataract were shown during the moon, it did not shift to a critical cataract which is visually accepted to be granulative.

[0013] It is a tablet by the example of pharmaceutical preparation for the patient of an example of clinical trial diabetic simple retinopathy 1 Day 1 Time 1 Addressing to a lock, 2 Periodical eyegrounds view administer orally over every year and according to a family doctor The place which examined the effectiveness of SNK-860, Aggravation of a symptom, and laser flare SERUME It does not accept but the increment in the flare to the inside of the aqueous humor measured by - TA is SNK-860. That they are inhibition thru/or the thing delayed at least became whether to be \*\* about advance of a simple retinopathy. [0014]

[Effect of the Invention] Without reducing the plasma glucose level accompanying diabetes mellitus intentionally, \*\* by this invention prevents formation of a retinopathy, the edema of the retina especially accompanying a diabetic simple retinopathy, and extraphysiologic wavelike structure, the hyperplasy of the basement membrane in the capillary blood vessel wall of a retina and disappearance of the capillary perithelium, and formation of a microvessel phyma, and prevents bleeding. Therefore, \*\* by this invention

delays sharply advance of diabetic retinopathy, i.e., the shift to a fecundity retinopathy from a simple retinopathy, or prevents and prevents concurrence of a still more critical cataract.

---

[Translation done.]

(51)Int.Cl. <sup>6</sup> A 6 1 K 31/415	識別記号 ADP ABL AED	庁内整理番号 7019-4C	F I	技術表示箇所
// C 0 7 D 491/107				
審査請求 未請求 請求項の数1 O L （全 5 頁）				
(21)出願番号  (22)出願日  特許法第30条第1項適用申請有り 1993年10月、OKA YAMA U X I V E R S I T Y M E D I C A L S C H O O L発行の「A c t a M e d i c a O k a y a m a」に発表	(71)出願人 000144577 株式会社三和化学研究所 愛知県名古屋市東区東外堀町35番地 (72)発明者 秋田 昌彦 愛知県名古屋市東区東外堀町35番地 株式 会社三和化学研究所内 (72)発明者 水野 邦治 愛知県名古屋市東区東外堀町35番地 株式 会社三和化学研究所内 (72)発明者 松原 旭 愛知県名古屋市東区東外堀町35番地 株式 会社三和化学研究所内 (74)代理人 弁理士 佐々木 功 （外1名） 最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 糖尿病性単純網膜症の進行阻止剤乃至治療剤

(57)【要約】

【目的】 糖尿病性単純網膜症の進行阻止剤乃至治療剤を提供する。

【構成】 この剤は有効成分として (2S, 4S)-6-フルオロ-2', 5'-ジオキソスピロ[クロマン-4, 4'-イミダゾリジン]-2-カルボキサミドを含有している。

【効果】 糖尿病に伴う血漿グルコース・レベルを有意に低下させ、合併症として発症する糖尿病性単純網膜症に伴う網膜の浮腫及び病理的波状構造の形成、網膜の毛細血管壁における基底膜の肥厚や毛細血管周皮細胞の消失、微小血管瘤の形成を阻害し、斯くて網膜症の進行、即ち単純網膜症から増殖性網膜症への移行を大幅に遅延させ、又は阻止し、更には重篤な白内障の併発を阻止する。



## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 (2S, 4S)-6-フルオロ-2', 5'-ジオキソスピロ[クロマン-4, 4'-イミダゾリン]-2-カルボキサミドを有効成分とする、糖尿病性単純網膜症の進行阻止剤乃至治療剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は糖尿病性単純網膜症の進行阻止剤乃至治療剤に係る。

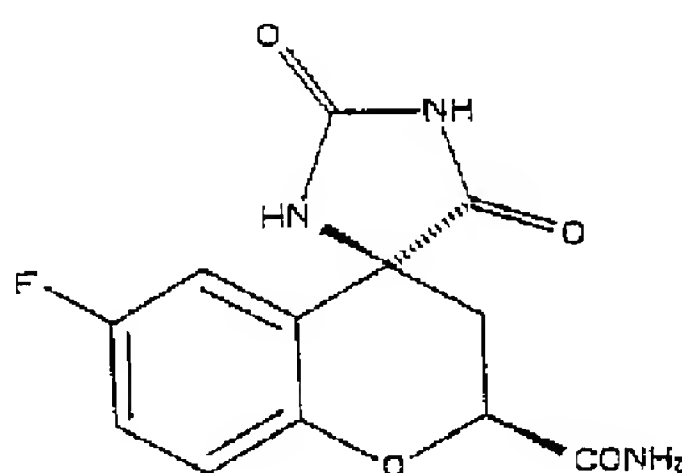
## 【0002】

【従来の技術】 我国における糖尿病患者は潜在的に約 600 万人と称されており、食生活文化の進展に伴い今後も益々増加するものと予測されている。糖尿病は、それ自体には余り問題はないが、難治性の且つ慢性的な合併疾患を伴い易いことに課題がある。本発明が関与する糖尿病性網膜症は糖尿病の発症から 10 年余りで糖尿病性単純網膜症を併発し、次いで増殖性網膜症に進行して網膜剥離を生じ失明をもたらすことがある。この糖尿病性網膜症に対する有効な治療剤は現在までの処存在せず、血糖のコントロールが唯一の治療法であるが、完全な血糖コントロールは極めて困難と云うよりも不可能に近く、かなりコントロールしたとしても眼底所見では 1 - 2 年間で確実に症状の進行が認められる等非常に厄介であり、有効な治療剤の開発が強く望まれていた。

【0003】 尚、外科的な療法であって唯一有効とされる光凝固術は前増殖・増殖性網膜症を対象とする治療法であるが、網膜症の進展は阻止できず、最終的には網膜剥離、失明に至ることがある。従って、糖尿病性網膜症は患者の増加もさることながら、医療費、福祉、クオリティー・オブ・ライフの面で近い将来、社会問題化すると考えられており、その対策が切に望まれている。

【0004】 処で、本発明者を含む本出願人会社の研究者は、従来から糖尿病合併症の予防乃至治療剤に関する研究を鋭意行っており、或る種のヒダントイン誘導体がアルドース還元酵素に対する阻害作用を有しており、生体内においてアルドース、例えばグルコースやガラクトースが上記の酵素により還元されて対応するポリオール、例えばソルビトールやガラクトールとなり、これらのポリオールが局所に蓄積されて発症するものとされている糖尿病合併症の予防や治療に有望であることを既に見い出している（特公平 3 - 72226 及び同 3 - 72227 公報）。殊に、式

## 【化 1】



にて示される (2S, 4S)-6-フルオロ-2', 5'-ジオキソスピロ[クロマン-4, 4'-イミダゾリン]-2-カルボキサミド（"S" は本来「イタリック体」にて表示すべきではあるが、外字となるので、英文字の --S-- を以って表示する）は糖尿病性神経疾患、即ち糖尿病に起因して脊髄の後根、後柱を侵される疾患及び神経炎の治療剤として製造承認を受けるための治験の最終段階にある（治験薬番号：SNK-860）。

## 【0005】

10 【発明が解決しようとする課題】 本発明者等は上記の (2S, 4S)-6-フルオロ-2', 5'-ジオキソスピロ[クロマン-4, 4'-イミダゾリン]-2-カルボキサミド（以下「SNK-860」と称することもある）に関する研究を種々の面から更に重ねた。これらの研究の中で、ヒトの糖尿病性網膜症の病態、症状の進行状況等を良好に反映する動物実験モデル系を構築して検討を行った結果、この SNK-860 は、従来のアルドース還元酵素阻害剤からでは到底考えられない薬理作用を有すること、即ちストレプトゾトシン (Streptozotocin, 以下「STZ」と称する) をラットに  
20 投与して糖尿病性単純網膜症を誘起させ、次いで上記の化合物を 12 ヶ月間にわたり連日投与した処、網膜における病変、即ち網膜の外層における波状構造及び浮腫の形成、網膜毛細血管壁における周皮細胞の消失、網膜毛細血管における基底膜の肥厚、網膜内顆粒層における微小血管瘤の発生を顕著に抑制するとの眼底所見が得られ、従って SNK-860 は糖尿病性単純網膜症に対して進行遅延乃至阻止作用を有し、以って単純網膜症から増殖性網膜症への移行を遅延乃至阻止し、延いては網膜剥離・失明を遅延乃至阻止する作用を有していることが判明  
30 し、斯くて本発明を完成するに至った。

## 【0006】

【課題を解決するための手段及び作用】 従って、本発明の要旨は、(2S, 4S)-6-フルオロ-2', 5'-ジオキソスピロ[クロマン-4, 4'-イミダゾリン]-2-カルボキサミドを有効成分とする糖尿病性単純網膜症の進行阻止剤乃至治療剤にある。

【0007】 本発明による剤は通常の製剤技術により、例えば錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、液剤、シロップ剤として経口的に、或いは注射剤、坐剤等として非経口的に投与することができ、固形剤の場合には製剤化に際して薬理学的に認容し得る賦形剤、例えば澱粉、乳糖、精製白糖、グルコース、結晶セルロース、カルボキシセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシエチルセルロース、磷酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、アラビアゴム等を用いることができ、必要であれば滑沢剤、結合剤、崩壊剤、被覆剤、着色剤等を配合することができ、又液剤の場合には安定剤、溶解助剤、懸濁化剤、乳化剤、緩衝剤、保存剤等を用いることができるが、精製白糖を配合した経口剤が好ましい。投  
50 与量は症状、年齢、投与法、剤型等により異なるが、通

常の場合には、成人に対し上記の化合物として 0.125 - 100mg/day を 1 日当たり 1 回又は数回に分けて連日投与するのが好ましい。尚、糖尿病合併症の治療のためには比較的長期にわたる連投が必要であるが、上記の S NK-860 は安全性において極めて高いことが既に認められている。

【0008】  
【実施例等】次に、実施例としての製剤例、薬効薬理試験例（動物実験）及び臨床試験例により、本発明を更に詳細に且つ具体的に説明する。

製剤例（錠剤）  
下記の諸成分を配合し、常法により打錠して 1000 錠の錠剤を得た（各錠剤は有効成分である SNK-860 を 1mg 宛含有）。

SNK-860	1.0 (g)
精製白糖	30.0
結晶セルロース	15.6
カルボキシメチルセルロース (Ca)	8.4
トウモロコシ澱粉	12.0
ステアリン酸マグネシウム	1.2
乳糖	残部
	100.0 (g)

【0009】薬効薬理試験例

(1) 試験目的  
STZ の投与により誘起された糖尿病ラットに合併症として発症する単純網膜症に対する SNK-860 の効果を調べる。

【0010】(2) 実験動物、試験方法等

(A) 実験動物  
7 週齢であって、平均体重約 200g の SD 系雄性ラット。

(B) 糖尿病誘起薬  
STZ (米国、Sigma 社製)。

(C) SNK-860  
本出願人会社製の化合物を 5% アラビアゴム溶液に懸濁させたもの。

(D) 投与方法  
実験動物に CRF-1 (神奈川県在、チャールズ・リバー・ジャパン社から市販のもの) を給餌し且つ水は自由摂取として、12 時間サイクルで点灯と消灯を繰り返しながら 1 週間飼育して馴化させた (馴化期間以降の給餌及び給水は上記の条件と同様)。次いで、実験動物を 1 群当たり 10 匹の 3 群に分け、群 I 及び II の実験動物には、0.05M クエン酸緩衝液 (pH 4.5) に溶解させた STZ を 40mg/kg (体重) の割合で尾静脈投与することにより糖尿病を誘発させた。群 III の実験動物には、STZ を含有しない上記のクエン酸緩衝液を尾静脈に投与し、コントロールとした。STZ の投与から 4 日目に、ヘパリン化採血器を使用し、左眼血管から血液を採取し、4℃

において 1700 x g で 10 分間遠心することにより血漿を得た。この血漿をサンプルとし、グルコースオキシダーゼとパーオキシダーゼとを使用する酵素法 (Glucose B-test Wako) によりグルコース濃度を推定した。群I 及び II の実験動物であって、グルコース・レベルが 300mg/dl 以上の動物を糖尿病を発症した動物として選択した処、最終的には両群共に、それぞれ 5 匹であった。STZ 投与後 4 日目から、群 I の動物には SNK-860 を 2mg/kg (体重) の割合で 1 日 1 回強制的に経口投与し始め、12 ヶ月にわたり連続投与した。SNK-860を投与しなかった群 II の STZ 糖尿病動物群及び群 III のコントロール群にはSNK-860 の代わりに 5% アラビアゴム溶液を連続投与した。

(E) 標本の作成  
12 ヶ月の飼育期間を経た後に、血液を抜くことにより全実験動物を殺害し、各 実験動物の右眼球を直ちに切り出し、0.1M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) に添加した 2.5% グルタルアルデヒドにより 4℃ において 60 分間処理して固定した。この固定処理後に、前部セグメントの位置で切開し、4℃ で 24 時間インキュベーションし、次いで 0.2% 蔗糖含有 0.05M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4)に移した。エタノール勾配法により組織の脱水を行い、パラフィン中に埋入した。網膜層と直角となるように組織片を切り出し (厚み 3 - 5μm)、ヘマトキシリン-エオシン (Hematoxylin-eosin, HE) と過沃素酸シッフ反応 (periodicacid-Schiff reaction, PAS reaction) により染色を施した。アルブミンの免疫組織化学的染色用に、抗ラット血清アルブミン ウサギ IgG を使用する、標識化ストレプタビジン ビオチン 法 (labelled streptaavidin biotin method、DACO社製、LSAB キット・システムを使用) を採用した。網膜の脈管構造に対するSNK-860 の効果を評価するために、PAS 染色サンプルの、次いでアルブミン染色サンプルの全網膜層について、網膜毛細血管の周皮及び内皮細胞核の数を外網状層から内核層 (内顆粒層) まで及び内網状層から神経線維層まで計測した。

【0011】(3) 結果  
(A) 血漿グルコース濃度と体重とに及ぼす SNK-860 の影響

下記の表 1 に示される通りであり、群 I (SNK-860 にち処置された STZ 糖尿病群) の血漿グルコース・レベルは、群 III (STZ 無投与のコントロール群) と比較する場合に約 2 倍であるが、群 II [SNK-860 にて処置しなかった STZ 糖尿病群 (コントロール群の約 2.5 倍)] よりも明らかに低かった。

【0012】

【表1】

	群 I	群 II	群 III
体重 (g)			
試験開始時	225 ± 2	229 ± 11 *	246 ± 7
試験終了時	312 ± 11	382 ± 10 *	657 ± 36
グルコース・レベル (mg/dl)			
試験開始時	402 ± 20 **	480 ± 82 **	82 ± 3
試験終了時	419 ± 41 **	502 ± 65 **	185 ± 20

コントロール群と比べて有意差あり、\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$

#### (B) 浮腫及び病理的波状構造の形成

HE 染色組織を光学顕微鏡により検査した。群 II (SNK-860 にて処置しなかった STZ 糖尿病群) の全例に網膜浮腫乃至細胞の脱離に関連した病理的な波状構造が認められた。殊に 1 例は明白な病変であった。群 I (SNK-860 にて処置した STZ 糖尿病群) 及び群 III (STZ 無投与のコントロール群) には網膜浮腫、波状構造及びその他の関連病変が 1 例も見当たらなかった。群 II のラットにおいて網膜における病的波状構造の形成に起因する網膜組織の歪曲は網膜の内層よりも外層において明白であった。波状構造部の基部において、網膜は網膜色素上皮組織から剥離しているのが度々観察され、又網膜色素上皮組織に悪化乃至退化的変化は認められなかったが、アルブミン染色に対して明確なポジティブ反応を示した。網膜の全層に観察された浮腫は視束乳頭領域において顕著であった。STZ 糖尿病ラットにおいて認められたこれらの病変は、SNK-860 を投与した糖尿病ラット及び STZ を投与しなかったコントロール・ラットには認められなかった。従って、SNK-860 は、神経節細胞層及び内網状層における浮腫の形成を有効に阻害することが明らかとなった。

#### (C) 網膜毛細血管における病変 (毛細血管基底膜肥厚及び毛細血管周皮細胞の消失)

STZ 糖尿病ラット (群 II) は、網膜毛細血管基底膜及び網膜の外層において顕著な肥厚を示し、又若干の例においては、非糖尿病ラット (群 I 及び III) よりも強い PAS 染色をもたらした。SNK-860 処置糖尿病ラット (群 I) においては、コントロール・ラット (群 III) と比較して、網膜毛細血管基底膜が一般に薄いように見受けられた。内網状層から神経線維層まで明確ではないが、STZ 糖尿病ラットの外網状層から内顆粒層までには血管周皮細胞数 (P) と血管内皮細胞数 (E) との比 (P/E 比) で示される血管周皮細胞数の明白な消失が認められた。SNK-860 処置糖尿病ラットは、外網状層から内顆粒層に至るまで血管周皮細胞層の消失が著しく少なく、正常に近い P/E 比を示した。上記の結果は図 1 に示されている。

#### (D) 微小血管瘤の有無

STZ 糖尿病ラット (群 II) には、網膜毛細血管に微小血管瘤の形成が観察されたが、SNK-860 処置糖尿病ラット (群 I) 及びコントロール・ラット (群 III) には認められなかった。内顆粒層に認められる微小血管瘤は、血管内のスペースに血球が満たされており、周囲は内皮細胞で囲まれ、内径はおよそ静脈大であった。STZ 糖尿病ラットの外網状層には PAS 染色にポジティブな顆粒が若干認められたが、SNK-860 処置糖尿病ラット及びコントロール・ラットには、このような傾向が何等認められなかった。

#### (E) 免疫組織化学的染色結果

STZ 糖尿病ラット (群 II) における波状構造部の下部領域には、免疫組織化学的染色が生じ、網膜血管からアルブミンが漏洩したこと、即ち点状、しみ状及び線状出血の生じたことを示した。

#### (F) 白内障併発の有無

STZ 糖尿病ラット (群 II) は全例において、STZ 投与から 3 ヶ月以内に重篤な白内障を併発した。SNK-860 処置糖尿病ラット (群 I) においては、白内障の発症が STZ 投与から 6 ヶ月後に遅延し且つ STZ 投与から 6 - 12 ヶ月の間に白内障に関する或る種の症候を示したが、視覚的にザラザラと認められるような重篤な白内障には移行しなかった。

#### 【0013】臨床試験例

糖尿病性単純網膜症の患者を対象として、製剤例による錠剤を1日1回1錠宛、2年間にわたり経口投与し、主治医による定期的な眼底所見により SNK-860 の効果を検討した処、症状の悪化及びレーザーフレアーセルメータにより測定された房水中へのフレアーの増加は認められず、SNK-860 は単純網膜症の進行を阻止乃至少なくとも遅延させるものであることが明かとなった。

#### 【0014】

【発明の効果】本発明による剤は糖尿病に伴う血漿グルコース・レベルを有意に低下させることなく、網膜症、殊に糖尿病性単純網膜症に伴う網膜の浮腫及び病理的波状構造の形成、網膜の毛細血管壁における基底膜の肥厚や毛細血管周皮細胞の消失、微小血管瘤の形成を阻止し、出血を防止する。従って、本発明による剤は糖尿病



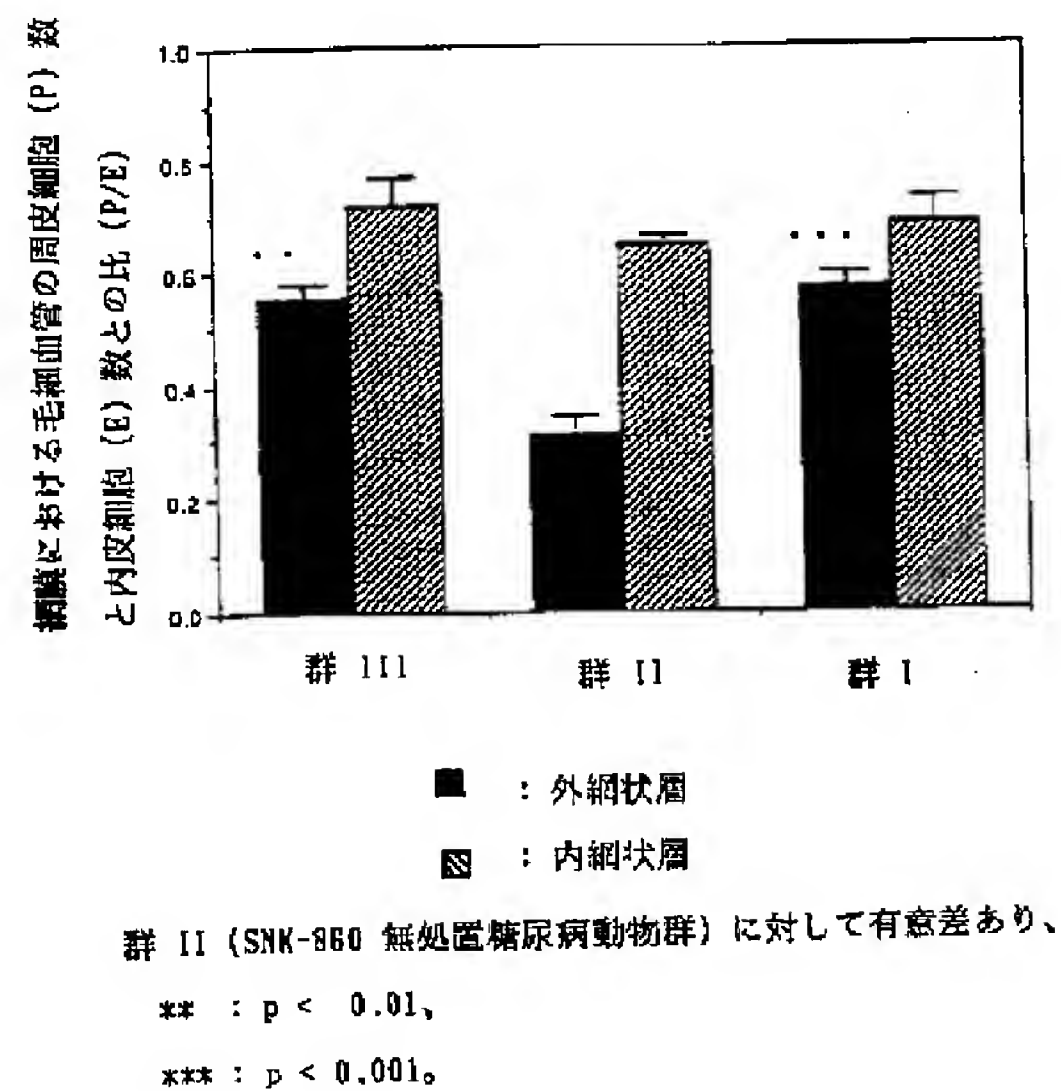
7  
性網膜症の進行、即ち単純網膜症から増殖性網膜症への移行を大幅に遅延させ、又は阻止し、更には重篤な白内障の併発を防止する。

【図面の簡単な説明】

【図1】 SNK-860 処置糖尿病ラット（群 I）と、SNK-86

0 無処置糖尿病ラット（群 II）と、コントロールとしての非糖尿病ラット（群 III）とに関して、網膜における毛細血管の周皮細胞数と内皮細胞数とを計数し、その比を示したグラフである。

【図1】



フロントページの続き

(72)発明者 中野 万正  
愛知県名古屋市東区東外堀町35番地 株式  
会社三和化学研究所内

(72)発明者 黒野 昌庸  
愛知県名古屋市東区東外堀町35番地 株式  
会社三和化学研究所内